

Zum Verhalten von Rinder- und Schweineeizellen bei der Tiefkühlkonservierung

von

HORST RÜDIGER ZAUBZER
aus Krefeld

1977
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548222_0026

Aus der Klinik für Frauenheilkunde mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. K. G. Ober

Zum Verhalten von Rinder- und Schweineeizellen bei der Tiefkühlkonservierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem

Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

HORST RÜDIGER ZAUBZER

aus Krefeld

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. K.-G. Bregulla

Korreferent: Prof. Dr. K.-G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 1977

Meinem lieben Großvater

H A N S Z A U B Z E R

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	3
II. Methodik	6
III. Ergebnisse und Diskussion	9
IV. Zusammenfassung	12
V. Literatur	13
VI. Anhang	16
A) Bilder	16
B) Tabellen	23
VII. Biographische Daten	27

I. Einleitung:

Im niederen Tierreich gibt es viele Ereignisse, die die Möglichkeit der Einschränkung des Zellstoffwechsel und die Konservierung der Lebensfähigkeit einer Zelle oder eines Organismus durch Kälte beweisen. Daß solche Beobachtungen auch für höhere Tierarten zutreffend sind, ist unbestritten, seitdem es gelungen ist, einzelne Säugerzeller abgekühlt und eingefroren überleben zu lassen. Die Tiefkühlkonservierung tierischer Keimzellen, vorwiegend der Samenzellen, war eine logische Folge - Zucht - probleme Schrittmacher dieser Entwicklung. Die letzten Erfolge der Zoologen und Veterinärmediziner waren die Transplantationen eingefrorener Kaninchen-, Mäuse- und Rinderembryonen (12, 17, 20).

Für die Humanmedizin ist die Gefrierkonservierung ebenfalls bedeutend. Die ersten Erkenntnisse dafür liegen Jahrhunderte zurück. Während bereits MANTEGAZZA 1866 die Verlängerung der Überlebenszeit menschlicher Spermien bei niederen Temperaturen erkannte, war es doch erst seit den Dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts möglich, die Tiefkühlkonservierung menschlichen Spermias auszubauen (5, 14). Die Herstellung des Kryospermias und die Behandlung mit diesen Keimzellen bei der Insemination ist heute eine Routinemethode geworden (1). Seit wenigen Jahren werden Blutzellen ebenfalls in flüssigem Stickstoff gelagert (10, 13, 16). Auch menschliche Eizellen sind versucht worden einzufrieren (2, 3). Über die Kryokonservierung menschlicher Embryonen gibt es noch keine Publikation.

Bei einem Vergleich der Untersuchungen menschlicher und tierischer Zellen oder Zellverbände bis zum Organ ist

es wohl so, daß sich einzelne Zellen leichter einfrieren lassen als Zellverbände oder ganze Organe (9, 11). Zum Einfrieren sind intra- und extrazellulär wirksam werdende Schutzstoffe notwendig (12). Glyzerin und Dimethylsulfoxyd sind häufiger benutzt worden als Polyvinylpyrrolidon oder Dextran. Außer den Schutzstoffen sind Einfrier- und Auftautemperatur in Abhängigkeit von der Zeit entscheidend (7). Bei den Untersuchungen tierischer Embryonen hat sich gezeigt, daß die Überlebensrate der Embryonen dann besonders günstig war, wenn sie nicht im Zwei- bis Vierzellenstadium, sondern im Vier- bis Sechszehnzellenstadium eingefroren wurden (20). Ein Teil der Blastomeren geht bei der bis heute angewandten Einfrier-technik zugrunde. Der überlebende Teil reicht dann aber aus, um mit seiner Pluripotenz doch zu einer gesunden Frucht nach der Transplantation auszuwachsen (20).

In der Humanmedizin ist der Gynäkologe bemüht, steril verheirateten Frauen zu helfen. Bei den Frauen, denen die Eileiter in Folge einer Entzündung verschlossen sind, ist die medikamentöse oder operative Behandlung nur in einer sehr geringen Zahl erfolgreich. Die Punktion einer Eizelle, die nachfolgende extrakorporale Reifung und Befruchtung mit der sich dann anschließenden Transplantation eines Embryos könnte als Behandlung überlegt werden. Versuche dafür gibt es (4, 6, 8, 15). Der Erfolg steht noch aus. Wenn man aber wieder die Ergebnisse der Veterinärmediziner kennt, so ist das in der Humanmedizin, bis es gelingt, wohl nur eine Frage der Zeit. Letztlich wird man für solche Transplantationen mehrere Eizellen oder Embryonen brauchen. Die Lagerung der Eizellen wird notwendig sein. Die Kältekonservierung bietet sich dafür an (2).

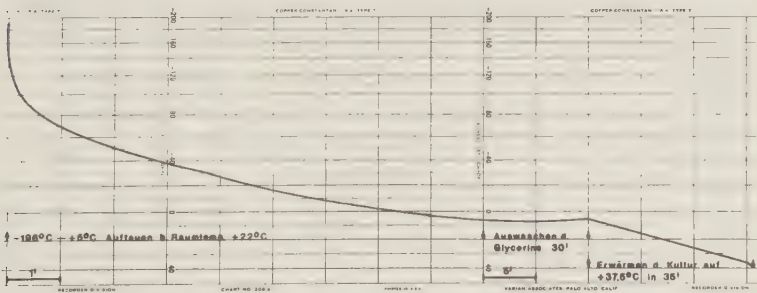
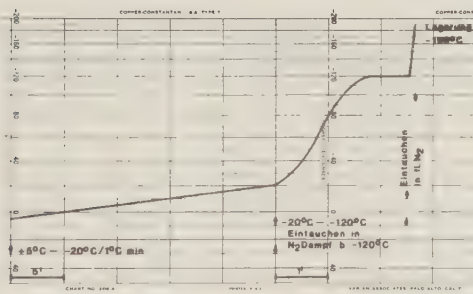
Um in Vorversuchen Glyzerin und DMSO-Konzentration für das Einfrieren unbefruchteter menschlicher Eizellen zu testen und brauchbare Schutzmedien zu finden, wurden diese Untersuchungen gemacht. Menschliche Eizellen gibt es aus verständlichen Gründen nur in einer sehr kleinen Anzahl für solche Experimente. Der tierischen Eizelle kann im Modellversuch bedingt ein der menschlichen Eizelle ähnliches Verhalten während der Kryokonservierung unterstellt werden. Zur Untersuchung wurden deshalb Rinder- und Schweineeizellen benutzt.

II. Methodik:

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden Rindern und Schweinen aus den Ovarien die Oozyten abpunktiert. SHETTELS hat die Punktionstechnik beschrieben (15). Mit einer Nadel wurden der Follikel angestochen und das Ovulat (Follikelflüssigkeit, Granulosazellen, Eizelle) aspiriert. Das Punktat wurde in ein Medium aus Ringerlösung + Medium TC 199 im Verhältnis 1:1, dem 10% Kälberserum sowie Penicillin (1 Mill 1/1) und Streptomycin (0,5 g/l) zugesetzt waren, umgesetzt, unter dem Stereomikroskop beurteilt, in einen Kolben umgefüllt und mit der protektiven Substanz verdünnt. Das Einfriermedium bestand dann aus dem Medium mit Glyzerin oder DMSO-Zugabe. Die Glyzerinendkonzentrationen betrugen 25, 30, 35, 40, 45 und 50 Vol %. Für das DMSO wurden Konzentrationen von 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40 und 45 Vol % gewählt.

Während die Beobachtung des Punktates und das Umsetzen in das Kulturmedium bei Zimmertemperatur erfolgte, kamen nach einer Abkühlung um 1° /min bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ Glyzerin und Dimethylsulfoxyd tropfenweise unter leichtem Schütteln hinzu. Die Adaptationszeit der Oozyten in dem Einfriermedium betrug 15 min, danach wurden sie in Kunststoffröhrchen (Pailletten) gemeinsam mit dem Einfriermedium aufgesaugt und eingefroren. Für das Einfrieren waren Abkühlraten, wie sie von der Spermakryokonserverung her bekannt sind, entscheidend. Die Abkühlung von $+ 4$ auf $- 20^{\circ}\text{C}$ verlief um 5 bis $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, von $- 20$ bis $- 80^{\circ}\text{C}$ um $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Dann wurden die Pailletten direkt in den flüssigen Stickstoff ($- 196^{\circ}\text{C}$) eingelagert. Eine typische Einfrierkurve zeigt das Diagramm 1.

Diagramm 1: Einfrierkurve der Rinder- und Schweinekeimzellen. Der Verlauf der Kurve zeigt die Abhängigkeit der Temperaturerniedrigung von der Zeiteinheit.



Die Lagerung der gefüllten Pailletten in flüssigem Stickstoff bis zum Auftauen betrug zwischen 1 und 21 Tagen. Die Pailletten kamen zum Auftauen in einen Inkubator bei $+37^{\circ}\text{C}$. Nach dem Auftauen wurden die Oozyten in ihrem Medium auf einen Hohlsliffobjektträger übertragen und unter dem Mikroskop beobachtet. Für die Beurteilung der schädigenden Wirkung des Einfrierens und Auftauens wurde ausschließlich die grobe Morphologie der Eizelle berücksichtigt. Veränderungen an den Kernen, dem Plasma, Kern- oder Zellmembranen wurden registriert.

Für weitere Untersuchungen etwa die Kultivierung der Eizellen nach dem Einfrieren mit dem Ziel der extrakorporalen Reifung scheint es sinnvoll, die protektiven Medien aus der Kulturlösung auszuwaschen. Glyzerin und DMSO beeinflussen den Stoffwechsel der Zelle. Dieser Einfluß dürfte bei der Eliminierung bei $+5^{\circ}\text{C}$ gering sein (s. Abb. 7).

III. Ergebnisse und Diskussion:

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind nach Rinder- und Schweineeizellen geteilt in den Tabellen 1 - 4 wiedergegeben. In der Darstellung ist die Art der protektiven Substanz und ihre Konzentration berücksichtigt.

Einige typische Bilder von Rindereizellen, die die Zellstrukturen und -veränderungen vor dem Verdünnen mit dem protektiven Medium, vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen zeigen, sind mit den Abbildungen 1 - 7 dargestellt.

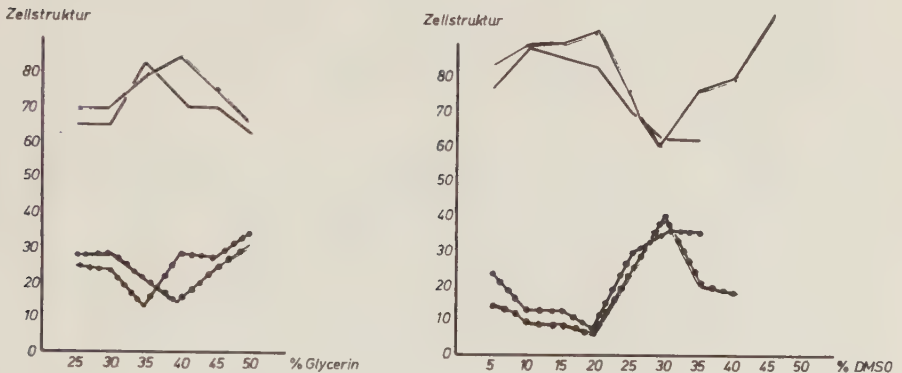
Rinder- und Schweineeizellen verhielten sich während der Kryokonservierung gleich. Nach dem Zufließen der protektiven Substanz kommt es, abhängig von der Konzentration, zu einer Schrumpfung des Zellkerns. Sie schwindet während der Adaptationszeit. Zellen deren Kernmembran bereits vor dem Einfrieren zerstört sind, zeigen diese Reaktion nicht. Nach dem Einfrieren und Auftauen sind an den Zellen häufiger die Kernmembranen als die Zellmembranen zerstört. Die schollenförmigen Dottermassen verteilen sich dann diffus im ganzen Zellinnern. Bei den Zellen, die eine intakte Kernmembran haben, fällt nach dem Einfrieren oft eine ungleichmäßige Verteilung der Dottersubstanz im Kern auf. Inwieweit diese andere Verteilung der Kernsubstanz mit einer Devitalisierung der Zelle verbunden ist, läßt sich aus diesen Untersuchungen nicht ableiten. Daß mit der Zerstörung der Kern- oder gar Zellmembran die Zelle zerstört ist, daran besteht kein Zweifel.

Ob die Zellen, die als intakt nach dem Einfrieren beurteilt wurden, auch noch zu einer weiteren Reifung fähig waren, bleibt offen. Nach dem Auftauen wurden die Zellen nicht weiter kultiviert.

Bei einem Versuch, die Daten der Tabellen graphisch darzustellen, würde man abhängig von der Glyzerin- oder DMSO-Konzentration den im Diagramm 2 gezeichneten Kurvenverlauf bekommen. Danach läßt sich keine Konzentration eines protektiven Mediums formulieren, die signifikant besser wäre als die anderen untersuchten Konzentrationen.

Bei dem multifaktoriellen Geschehen der Kryokonservierung läßt das die Vermutung zu, daß Adaptationszeit, Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit, Tiefsttemperatur und Lagerungsdauer sicher mit entscheidend sind. Danach wäre vielleicht die Konzentration der Schutzstoffe ein weniger entscheidendes Kriterium.

Diagramm 2: Abhängigkeit der mikroskopischen Kriterien für intakte Zell- und Kernmembranen bei der Kryokonservierung von Rinder- und Schweinekeimzellen von der Konzentration der protektiven Substanzen Glyzerin und DMSO.



In den Diagrammen sind abhängig von den Glyzerin- und DMSO-Konzentrationen die Kriterien für die mikroskopische Beurteilung der Zellstrukturen, soweit sie die Intaktheit der Zell- und Kernmembranen betrafen, eingetragen.

In beiden oberen Kurven sind jeweils die Daten vor und in den unteren beiden Kurven die Daten nach dem Einfrieren markiert. Die Differenz zwischen ihnen entspricht dem Verlust durch die Kryokonservierung.

Die schwarze durchgezeichnete Linie steht für das Verhalten der Rindereizellen, die gepunktete Linie für das der Schweinekeimzellen.

IV. Zusammenfassung:

Bei einem standardisierten Einfrier- und Auftauverfahren wurde das Verhalten von follikulären Rinder- und Schweineeizellen in Abhängigkeit von der Konzentration der protektiven Substanzen Glyzerin und DMSO untersucht. Die Rinder- und Schweineocyten kamen nach der Punktion in ein Kulturmedium und wurden mit Glyzerin-Endkonzentrationen zwischen 25 und 50% eingefroren. Die DMSO-Konzentrationen lagen zwischen 5 und 50%.

Der Erfolg der Kryokonservierung wurde an der Intaktheit der mikroskopisch beurteilbaren Zellstrukturen gemessen. Verletzungen der Zell- oder Kernmembranen traten bei der Zugabe von Glyzerin und DMSO etwa gleich häufig auf. Im Durchschnitt konnte an 40% der kryokonservierten Eizellen eine Schädigung an diesen Zellstrukturen nachgewiesen werden. Inwieweit die mikroskopisch unverletzt beurteilten Zellen nach dem Einfrieren noch vital waren, blieb unbekannt. Eine weitere Kultivierung nach dem Einfrieren und Auftauen ist nicht erfolgt.

Da sich für die Rinder- und Eizellen abhängig von der Art der protektiven Medien und ihrer Konzentration keine ganz markanten "Überlebensquoten" erkennen ließen, wird bei dem multifaktoriellen Geschehen der Kryokonservierung angenommen, daß Adaptationszeit, Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit, Tieftemperatur und Lagerungsdauer sicher mit entscheidend sind. Die Konzentration der protektiven Medien wäre dann nur von geringer Bedeutung.

V. Literatur:

1. BEHRMAN, S.J.: Freeze preservation of human sperm.
Amer. J. Obstet. Gynec. 103, 654 (1969).
2. BREGULLA, K.: Versuche zur Tiefkühlkonservierung
menschlicher Oozyten.
Vortrag: IV. Europ. Kongreß für Steri-
lität Madrid, Okt. 1975.
3. BURKS, J.L., M.E. DAVIS, A.H. BAKKEN, J.J. TOMASOVIC:
Morphologic Evaluation of Frozen Rabbit
and Human Ova.
Fertil. a. Steril. 16, 638 (1965)
4. EDWARDS, R.G.: Fertilisation and development of
preovulatory human oocytes in vitro.
In. VII World Congress on Fertility
and Sterility Tokyo/Kyoto
15-17 Oct. 1971 Excerpta Med. No. 134 b,
106 (1971)
5. JAHNEL, F.: Über die Widerstandsfähigkeit von
menschlichen Spermatozoen gegenüber
starker Kälte.
Klin. Wschr. 17, 1273 (1938)
6. KENNEDY, J.F., R.P. DONAHUE:
Human Oocytes: Maturation in chemical-
ly defined media.
Science 164, 1292 (1969)

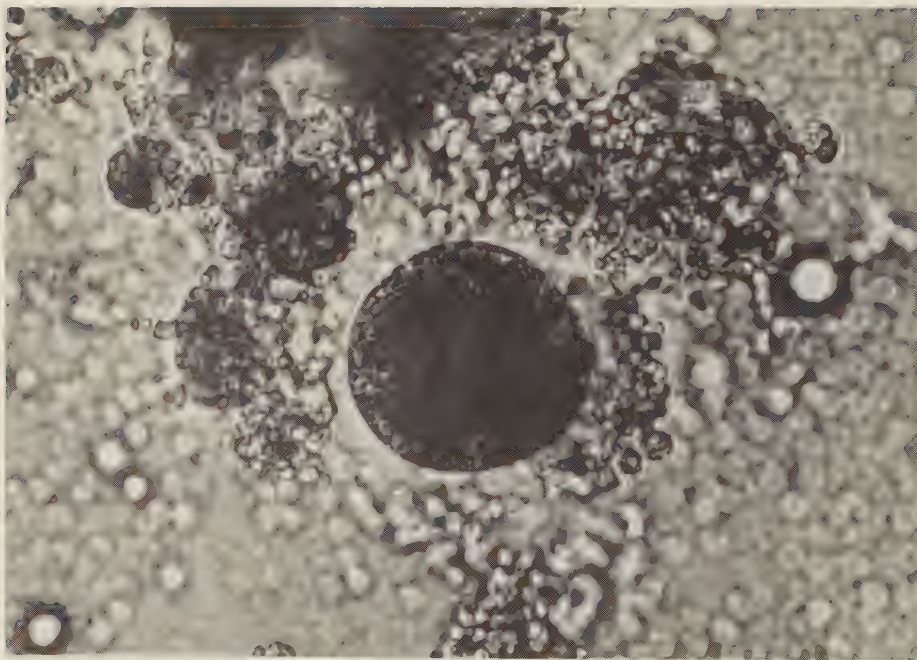
7. LEIBO, S.P., J. FARRANT, P. MAZUR, M.G. HANNA jr.,
L.H. SMITH:
Effects of Freezing on Marrow Stem Cell
Suspensions: Interactions of Cooling and
Warming Rates in the Presence of PVC,
Sucrose, or Glycerol.
Cryobiology 6, 315 (1970)
8. MASTROIANNI, L., C. NORIEGA:
Observations on human ova and the fer-
tilization process.
Amer. J. Obstet. Gynec. 107, 682 (1970)
9. MAZUR, P.: Theoretical and Experimental Effect of
the Cooling and Warming velocity on the
Survival of Frozen and Thawed Cells.
Cryobiology 2, 181 (1966)
10. MAZUR, P., S.P. LEIBO, R.H. MILLER:
The Response of Bovine Red Cells to
Freezing and Thawing as a Function of
the Permeation of Glycerol. II. The Ef-
fects of Freezing.
Cryobiology 8, 383 (1971)
11. MERYMAN, H.T.: The Interpretation of Freezing Rates
in Biological Materials.
Cryobiology 2, 165 (1966)
12. POLGE, C.A.U., A. SMITH, S. PARKES:
Survival of spermatozoa after vitrifi-
cation and dehydration at low tempera-
tures.
Nature 164, 666 (1949)

13. SEIDL, S.: Die Tiefkühlkonservierung von Blut.
Dtsch. med. Wschr. 93, 1861 (1968)
14. SHETTLES, L.B.: The respiration of human spermatozoa
and their response to various gases
and low temperatures.
Amer. J. Physiol. 128, 408 (1940)
15. SHETTLES, L.B.: Ovum Humanum. Wachstum, Reifung, Er-
nährung, Befruchtung und frühe Ent-
wicklung.
Urban & Schwarzenberg München -
Berlin 1960.
16. SMITH, A.U.: Prevention of Haemolysis during
Freezing and Thawing of Red Blood-
Cells.
Lancet II, 910 (1950)
17. WHITTINGHAM, D.G.: Survival of Mouse Embryos after
Freezing and Thawing.
Nature 233, 125 (1971)
18. WHITTINGHAM, D.G., S.P. LEIBO, P. MAZUR:
Survival of Mouse Embryos Frozen to
- 196° and -269° C.
Science 178, 411 (1972)

VI. Anhang:

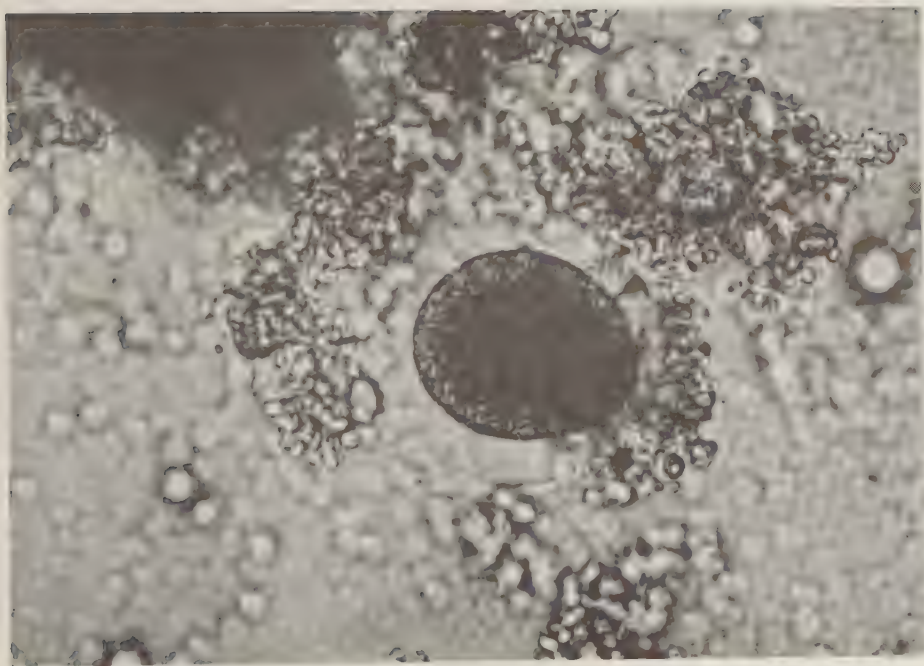
A) Bilder

Abbildung 1



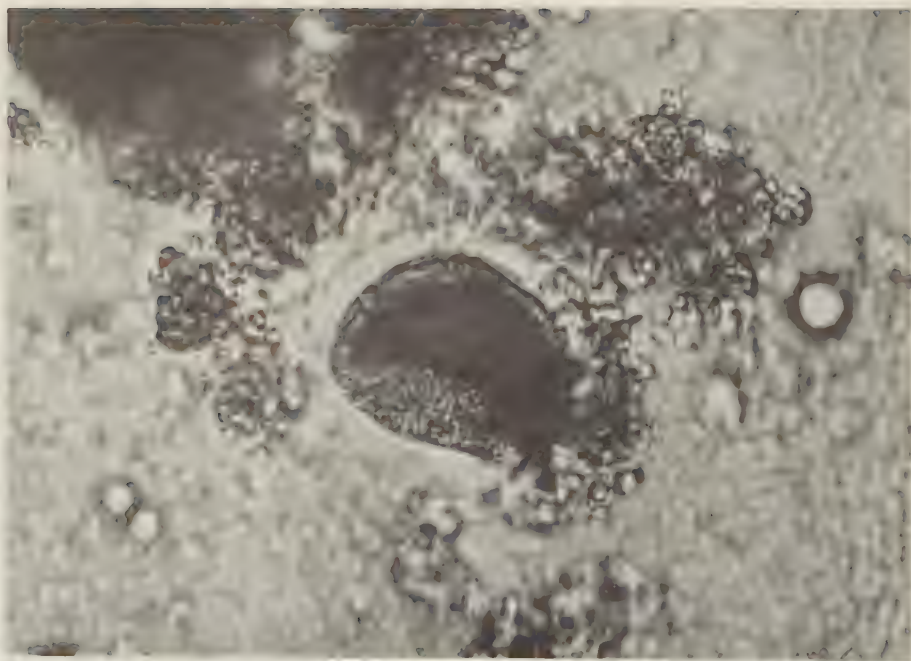
Punktierte follikuläre Rinderoocyte im Medium bei plus 5° C

Abbildung 2



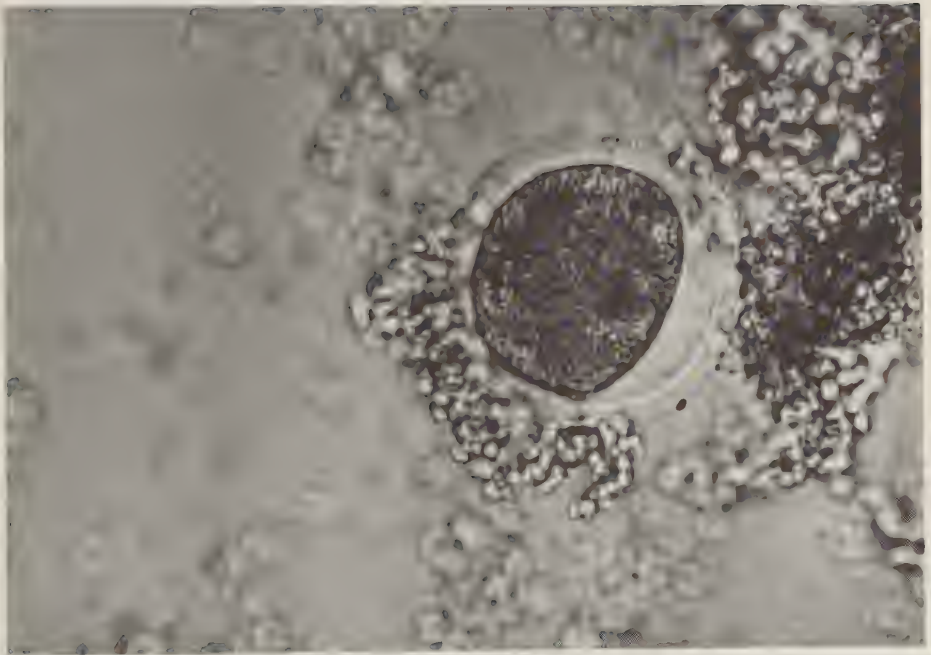
Follikuläre Rinderoocyte bei plus 5° C im Medium
mit eben beginnenden Glycerinzusatz. Der Zellkern
beginnt zu schrumpfen.

Abbildung 3



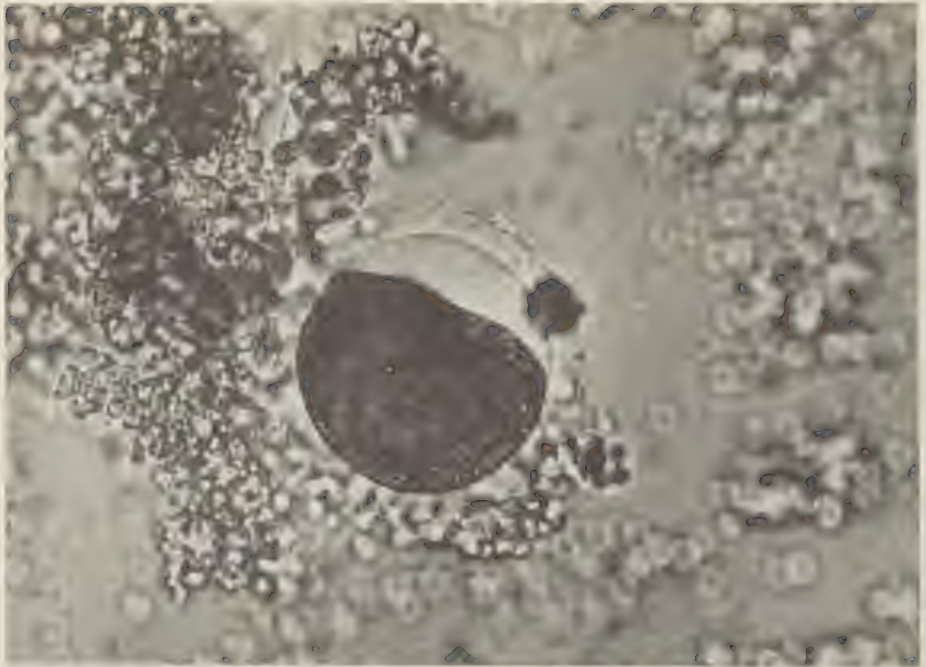
Bei schnellem Erreichen der Glyzerin-Endkonzentration tritt eine hochgradige Schrumpfung und Entrundung des Zellkerns auf. Medium-Temperatur plus 5° C.

Abbildung 4



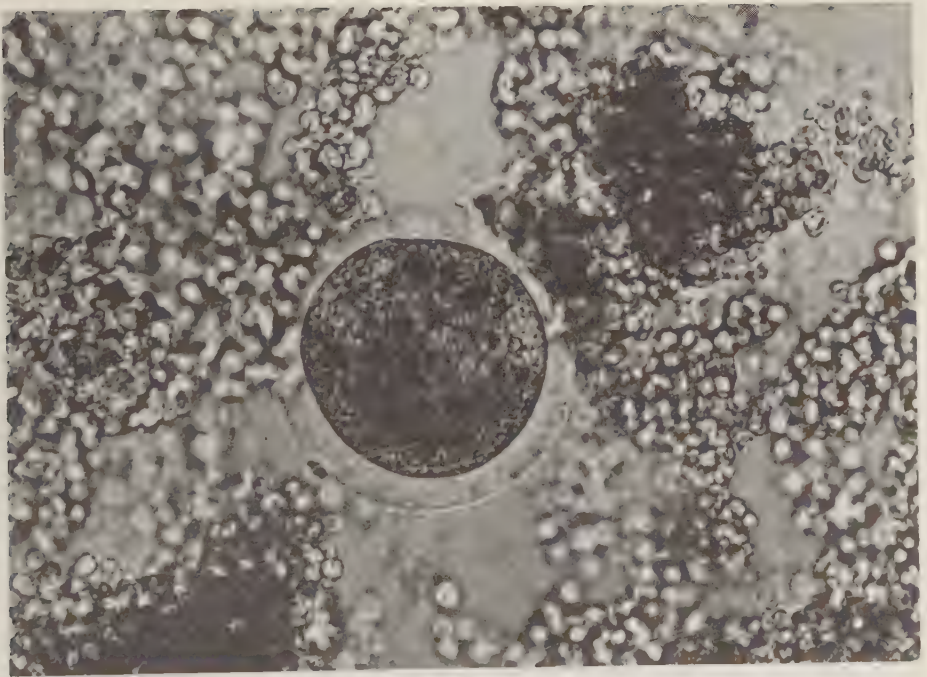
Unter den für die Abb. 2 - 3 beschriebenen Bedingungen kommt es mit zunehmender Adaptationszeit wieder weitgehend zur Rundung des Zellkerns, die bis zur Kristallisation beim Einfrieren erhalten bleibt und nach dem Auftauen wieder zu erkennen ist.

Abbildung 5



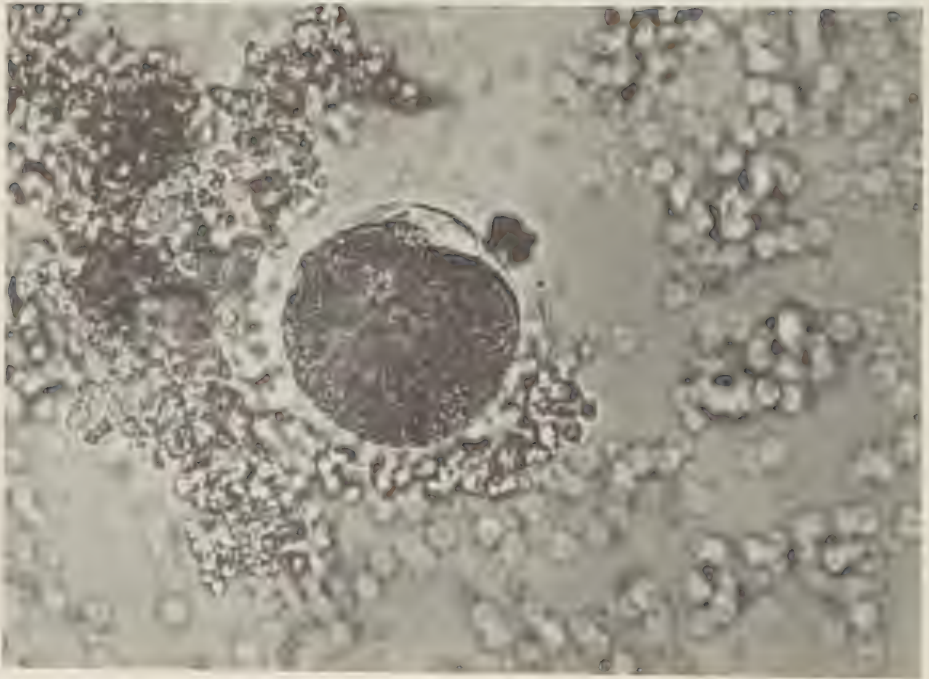
Follikuläre Rindereizelle nach dem Einfrieren und Auftauen. Das Glyzerin ist noch nicht ausgeschwemmt.

Abbildung 6



Nach dem Ausschwemmen des Glyzerins aus dem Einfriermedium innerhalb von 2 Stunden bei 5° C nimmt die follikuläre Rindereizelle wieder ihre ursprünglichen Konturen an.

Abbildung 7



Nach dem Ausschwemmen des Glyzerins und Erwärmen auf plus 37° C wird nach kurzer Zeit Pseudopolkörperchenbildung als Ausdruck möglicher erhaltener Vitalität sichtbar.

B) Tabellen

Tabelle 1

Gefrierkonservierung der Rinderoocyten

Einfriermedium Glyzerin

(Glyzerinendkonzentration 25 % - 50 %)

Glyzerin	intakte Oocyten	%	zerstörte Zellstruk- turen	%	Gesamtzahl
25%	6	25	18	75	24
30%	6	23	20	77	26
35%	2	23	12	86	14
40%	11	29	27	71	38
45%	2	29	5	71	7
50%	12	35	22	65	34

Tabelle 2

Gefrierkonservierung der Schweineoocyten

Einfriermedium Glyzerin (Glyzerinendkonzentration 25% - 50%)

Glyzerin	intakte Oocyten	%	zerstörte Zellstruk- turen	%	Gesamtzahl
25%	12	28	31	72	43
30%	11	28	28	72	39
35%	14	20	56	80	70
40%	7	15	39	85	46
45%	9	26	26	74	35
50%	16	33	33	67	49

Tabelle 3

Gefrierkonservierung der Rinderoocyten

Einfriermedium DMSO (DMSO - Konzentration 5% - 35%)

DMSO	intakte Oocyten	%	zerstörte Zellstruk- turen	%	Gesamtzahl
5%	2	25	6	75	8
10%	2	11	16	89	18
15%	3	13	20	87	23
20%	8	17	40	83	48
25%	4	31	9	69	13
30%	3	38	5	62	8
35%	3	38	5	62	8

Tabelle 4

Gefrierkonservierung der Schweineoocyten

Einfriermedium DMSO (DMSO - Konzentration 5% - 45%)

DMSO	intakte Oocyten	%	zerstörte Zellstruk- turen	%	Gesamtzahl
5%	5	15	28	85	33
10%	11	10	96	90	107
15%	4	8	45	91	49
20%	4	6	59	94	63
25%	5	25	15	75	20
30%	11	41	16	59	27
35%	9	23	31	77	40
40%	11	18	49	82	60
45%	-	-	37	100	37

VII. Biographische Daten

Name: Horst Rüdiger Z a u b z e r

Geboren: 23. 5. 1943

Schule: 1949 - 1952 Volksschule Nürnberg
1954 Dürer-Oberrealschule / Nürnberg
1962 Donau-Oberrealschule / Kehlheim
1964 Reifeprüfung

Studium: 1964 - 1972 Medizin-Studium Universität Erlangen

Med.Ass.-Zeit: 9/1972 - 9/1973 Innere und chirurg. Abteilung
Kreiskrankenhaus Lindau/Bodensee

Approbation: 9/1973

Assistenzarzt: 9/1973 - 6/1974 Chirurgische Abteilung
Kreiskrankenhaus Lindau/Bodensee
9/1975 - 3/1976 Chirurgische Abteilung
Krankenhaus Radolfzell/ Bodensee

Militär: 7/1974 - 9/1975 Stabsarzt
Luftwaffeneinheit Landsberg/Lech

Jetzige Tätigkeit:

Landarzt in Hergensweiler seit Juli 1976.
In der gleichen Praxis Assistent 4/1976 - 6/1976

Heirat: 1972; Kinder: eine Tochter.

Erlangen, im Januar 1977

Horst Rüdiger Zaubzer

